

## **Válasz Dr. Csörgő Sándorné Dr. Bata Zsuzsanna opponensi véleményére**

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Csörgő Sándorné Dr. Bata Zsuzsannának, hogy értekezésem bírálatát elvállalta, időt szakított annak alapos áttanulmányozására és értékelésére. Kritikai megjegyzéseit elfogadom. Köszönöm, hogy a benyújtott disszertációm tudományos szempontból értékesnek ítéli, alkalmasnak arra, hogy nyilvános vita keretében szélesebb körben bemutassam, valamint hogy támogatja az MTA doktora cím odaítélését.

Feltett kérdéseire az alábbiakat válaszolom:

**1./ A 36. oldalon leírt kísérletben különböző egereket használtak annak mérésére, hogy a pollen által okozott oxidatív stressz milyen mértékű. Minden egér azonos stressz marker indukciót mutatott, a stressz kialakulását a szenzibilizáció sem befolyásolta. Ezt követően a szenzitizált vad típusú egeret hasonlították össze a nem szenzitizált vad típusú egerekkel. Ismert, hogy az alkalmazott szenzibilizálási protokoll hogyan nem működik vagy működik a másik két egérben? Nehezen értelmezhető az az eredmény, hogy a szenzitizált egérben önmagában az antigén nem indukál sejtes infiltrációt, ahogy ez a 8 ábrán látható. Mi ennek a magyarázata?**

**Válasz:** A C57BL/6 egerekben kétszeri intraperitoneális allergén + Alum oltással kiváltható az allergén-specifikus IgE termelés, hasonlóan a Balb/c egerekhez (Morokata et al., *Immunology* 98: 345-351, 1999). Annak ellenére, hogy a C57BL/6 egerekben is magas allergén-specifikus IgE szint alakul ki a szérumban a szenzitizálást követően, a Balb/c egereket gyakrabban használják az asthma modellekben. Ennek az oka részben az, hogy a bronchiális hiperreaktivitás sokkal erősebb a szenzitizált Balb/c egerekben az allergén expozíciót követően, mint a C57BL/6 egerekben. A jelenség hátterében az állhat, hogy a szenzitizált és allergénnel kezelt C57BL/6 egerek légútjaiban kevesebb a hízósejt, és kevesebb Th2-citokin termelődik, mint a másik egértörzsben (Atochina et al., *Respir Res.* 4: 15, 2003; Gueders et al., *Int Arch Allergy Immunol.* 149: 195-207, 2009). A NOD (non-obese diabetic) egerek, amelyeket többnyire az inzulin-függő diabetes mellitus modelljeként használják, szintén szenzitizálhatók allergénnel, sőt az allergén-specifikus IgE termelés, és a

Th2-közvetített gyulladásos válaszok még intenzívebbek is, mint a Balb/c egerekben (Araujo et al., *Eur J Immunol.* 34: 327–335. 2004).

Az, hogy az Amb a 1 allergénnek önmagában igen csekély az allergiás reakciót kiváltó képessége, valószínűleg azzal magyarázható, hogy ez az allergén kevésbé hatékonyan hatol át a hámsejtek rétegén, és így nehezen éri el az IgE ellenanyagokkal fedett hízósejteket. A pollen NAD(P)H oxidázok által termelt ROS fokozhatja a légúti hám átjárhatóságát, és elősegítheti az allergén-hízósejt kölcsönhatás kialakulását. Ezt a feltételezést alátámasztja az a mások által leírt megfigyelés, hogy az oxidatív stressz képes csökkenteni a transzepithelialis rezisztenciát, és megbontani a hámsejtek közötti szoros kapcsolatokat (tight junctions), elsősorban a ZO-1 (zonula occludens 1) és a JAM-A (junctional adhesion molecule A) proteinekre hatva (Tharakan et al., *Int Forum Allergy Rhinol.* 6: 1145-1150, 2016). A kísérlet során humán nazális hámsejteket tenyésztettek levegő-folyadék határfázison, majd cigaretta füst kivonattal kezelték a sejteket. A kezelést követően egy órán belül 13%-kal csökkent a hámsejtréteg transzepithelialis rezisztenciája. Amennyiben a cigaretta füst kivonat kezelést megelőzően farmakológiailag aktiválták az Nrf2 transzkripció faktort, amely az antioxidáns fehérjék kifejeződését szabályozza, képesek voltak megelőzni a hámsejtréteg permeabilitásának fokozódását (Tharakan et al., *Int Forum Allergy Rhinol.* 6: 1145-1150, 2016).

## **2./ Hogyan győződtek meg a szenzitizációs protokoll hatékonyságáról az egereknél?**

**Válasz:** A szenzitizált egerek szérumban a parlagfű pollen-specifikus IgE ellenanyagok szintjét ELISA módszerrel határoztuk meg. A detektáláshoz a liofilizált parlagfű pollen kivonatot (Greer Laboratories) nátrium-acetát pufferben (0,1 M, pH 6,5) oldottuk fel, és ezzel az oldattal fedtük a 96 lyukú lemezeket (5 µg parlagfű pollen kivonat/0,1 ml/lyuk). A lemezeket egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A detektáláshoz biotinált, patkány anti-egér IgE ellenanyagot (R35-118; BD Biosciences-Pharmingen), avidinnel konjugált alkalikus foszfatáz enzimet (Sigma-Aldrich) és p-nitrofenil foszfát szubsztrátot (Sigma-Aldrich) használtunk. Megfelelő standard hiányában a parlagfű pollen-specifikus IgE ellenanyagok koncentrációját nem tudtuk meghatározni, azonban a kapott abszorbancia értékeknek a kontroll egerek (PBS-Alum elegyet oltottunk kétszer intraperitoneálisan) szérumban mintáinál mért abszorbancia értékekkel történő összehasonlításával a szenzitizáció hatékonysága megállapítható volt.

**3./ A további kísérletekből az derül ki, hogy az oxidatív stressz önmagában neutrophil dominálta gyulladást okoz, ezt a gyulladásos választ tolja el eosinophil irányba az allergén jelenléte. Vajon melyik típusú gyulladás rosszabb a tüdőszövet szempontjából? Mit lehet erről tudni?**

**Válasz:** Az asthmás betegekben akár a neutrophil, akár az eosinophil sejtek tartós jelenléte a tüdőszövetben kedvezőtlenül hat a légzőfunkciók ellátására. Az asthma többféle pathomechanizmus alapján is kialakulhat. Az indukált köpet és bronchusnyálkahártya-biopszia minták sejtes összetételének vizsgálata alapján több fenotípust különítettek el: eosinophil, neutrophil, kevert sejtes, paucigranularis formát (Nagy L.B., *Orv Hetil.* 158: 491-498, 2017). Ezek elkülönítésére az indukált köpetben javasolt határértékek: eosinophil fenotípus: eosinophil>3%; neutrophil fenotípus: neutrophil>61%; kevert fenotípus: eosinophil>3% és neutrophil>61%; paucigranularis: eosinophil<3% és neutrophil<61% (Simpson et al., *Respirology*, 11, 54–61, 2006).

Az eosinophil fenotípusú asthma atópiás egyéneknél alakul ki, a betegek jól reagálnak kortikoszteroid kezelésre. A csontvelőben termelődő eosinophilek dinamikusan áramlanak a vérben keresztül a légutakba, tehát a vérben és a légutakban is időben változó a mennyiségük. Allergénprovokáció hatására a számuk a vérben csökken, a hörgőben emelkedik (Kraszkó et al, *Pneumol. Hung.* 33, 481-486, 1980). Súlyos asthmában mind a vérben, mind a légutakban magas a számuk (Schleich et al., *Eur Respir J.*, 44, 97–108, 2014). Eosinophil fenotípus esetén a légutakban a limfociták (CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup>), a hízósejtek és a makrofágok száma is nagyobb, és a bazális membrán vastagabb, mint a nem eosinophil fenotípusnál (Fahy J.V., *Proc Am Thorac Soc.* 6: 256-259, 2009).

A legsúlyosabb asthma esetében neutrophil dominancia azonosítható a légutakban, de enyhe asthmában is a betegek jelentős része perzisztálóan nem eosinophil fenotípusú (McGrath et al., *Am J Respir Crit Care Med.*, 185, 612–619, 2012). Az indukált köpet neutrophiliája esetén szteroidra rosszul reagálnak a betegek (Green et al., *Thorax*, 57, 875-879, 2002). Neutrophil fenotípus esetén az anamnézisben gyakran található dohányzás, bakteriális légúti infekciók, és szennyezett levegőjű környezet (Halder és Pavord, *J Allergy Clin Immunol.* 119, 1043-1052, 2007). A neutrophil sejteknek meghatározó szerepe van az akut asthma rohamok kialakulásában is (Fahy J.V., *Proc Am Thorac Soc.* 6: 256-259, 2009). Fontos megjegyezni, hogy az eosinophil és neutrophil sejtek is mindig jelen vannak az asthmás tüdőben, az egyes fenotípusok csak az adott sejtípus dominanciájára utalnak. Az asthmában a tünetek, az obstrukció intenzitása hullámzó, a gyulladás változásának

megfelelően. Ezért rövidtávon (egy-másfél hónap) a köpet sejtösszetétele is ingadozhat, viszont a követéses vizsgálatok eredményei alapján az eosinophil, illetve neutrophil fenotípus a betegek jelentős részében fennmarad (Nadif et al., *Eur Respir J.* 48: 1040-1051, 2016).

**4./ A kötőhártya modellben az oxidatív stressz indukálta gyulladás is mastocytá degranulációt okozott, itt nem érzékelhető különbség a neutrophil és eosinophil dominanciájú gyulladás tekintetében?**

**Válasz:** Az allergiás conjunctivitis modellben kapott eredményeink összhangban vannak a légúti gyulladásos modellben tett megfigyeléseinkkel. Itt is azt tapasztaltuk, hogy a ROS-termelő enzimaktivitás és az allergén együttes jelenléte esetén a legerősebb az allergiás reakció intenzitása. A parlagfű pollen NAD(P)H oxidázai által kiváltott oxidatív stressz felerősítette az allergén által indukált korai allergiás tüneteket, és a gyulladásos sejtek beáramlását a kötőhártyába. Megfigyeléseink szerint az allergiás légúti gyulladás modelljében az eosinophil sejtek beáramlását a légutakba megelőzi a neutrophil sejtek akkumulációja. A neutrophilek beáramlása a tüdőszövetbe 4 órával a pollen expozíció után mutatható ki először, a toborzott neutrophilek száma 16 órával a kezelés után a legnagyobb, és 28 órára már jelentősen lecsökken. A conjunctivitis modellben a gyulladásos sejtek beáramlásának kinetikáját nem vizsgáltuk. A szövettani vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy 48 órával a parlagfű pollen kezelés után eosinophil sejtek azonosíthatók nagy számban a kötőhártyában. Az oxidatív stressz önmagában (xantin + xantin oxidáz) nem váltott ki azonnali allergiás tüneteket, és nem indukált eosinophil beáramlást a kötőhártyába.

**5./ A könnynek mekkora az antioxidáns kapacitása? Sjögren betegségben van-e adat arra, hogy gyakoribb és/vagy súlyosabb lenne az allergiás conjunctivitis előfordulása?**

**Válasz:** Egy saját vizsgálatban egészséges egyének (10 férfi és 10 nő, életkor 21 és 56 év között) könny mintáinak teljes antioxidáns kapacitását határoztuk meg kolorimetriás módszerrel. A méréshez egy kereskedelmi forgalomban kapható kit-et (Total Antioxidant Capacity Assay Kit, Calbiochem, Darmstadt, Németország) használtunk. Eredményeink szerint a könny teljes antioxidáns kapacitása  $693 \pm 52 \mu\text{M}$  Trolox (az E-vitamin vízóldékony

formája) ekvivalens. Viszonyításként, ugyanezen egyének szérumban mintáinak  $610 \pm 44 \mu\text{M}$  Trolox ekvivalens volt a teljes antioxidáns kapacitása.

Nem találtam olyan tanulmányt, amelyben az allergiás conjunctivitis előfordulását vizsgálták volna Sjögren szindrómás betegekben. Egy 1998-as tanulmányban Tishler és munkatársai 4 betegcsoportban (Sjögren szindróma /n=65/, rheumatoid arthritis /n=67/, rheumatoid arthritis + szárazszem tünetek /n=53/ és osteoarthritis /n=31/) vizsgálták az allergiás betegségek előfordulását (*Scand J Rheumatol* 27:166-169, 1998). Eredményeik szerint nem volt szignifikáns különbség az allergiás rhinitis/asthma előfordulási gyakoriságában a vizsgált betegcsoportokban (14%, 12%, 10%, illetve 6%). Egy másik tanulmány szerint azonban, amelyet sokkal több beteg bevonásával végeztek (1974 Sjögren szindrómás és 9870 véletlenszerűen kiválasztott, nem Sjögren szindrómás egyén), az asthma másfélszer gyakoribb a Sjögren szindrómásoknál, mint a nem Sjögren szindrómások körében ( $p < 0.001$ ) (Kang és Lin, *J Rheumatol* 37:1188-1194, 2010).

**6./ A szugifenyő és a kagylóciprus pollenek, melyek szabadgyököt termelnek, szintén erősen allergizálnak? Általában állítható, hogy a szabadgyök termelő pollenek erősebben képesek szenzibilizálni is?**

**Válasz:** Az első kérdésre határozott igen a válasz. A japán szugifenyő (*Cryptomeria japonica*) és a kagylóciprus (*Chamaecyparis obtusa*) pollenje a két fafaj elterjedési területén - a japán szigeteken, Tajvanon, és Kína dél-keleti partvidékén - a szezonális allergiás rhinitis leggyakoribb okozója (Asam et al., *Allergy* 70: 1201-1211, 2015). Japánban a fiatal felnőtteknek (20-29 évesek) több mint a fele szenzitizált legalább egy szugifenyő allergénnel szemben (Sakashita et al., *Int Arch Allergy Immunol* 151: 255–261, 2010). A két növényfaj fő allergénjeinek, a Cry j 1-nek és a Cha o 1-nek az aminosav szekvenciája 78,6%-os azonosságot mutat (Namba et al., *Allergol Int* 50: 133-142, 2001)

**7./ A DNS oxidatív sérülésének javítása elképzelhető, hogy több kárt okoz a gyulladás fokozásával, mint amennyi hasznot hajt? Erre utalnak az irodalmi adatok (Ogg1 kiütött egér)? Az Ogg1 enzim gátlása potenciális terápiás target lehet?**

**Válasz:** Valóban, számos megfigyelés támasztja azt alá, hogy a 8-oxoguanin DNS-glikoziláz 1 (OGG1) enzim működésének hiánya esetén a gyulladásos válaszok enyhébb lefolyásúak. Egy 2005-ben közölt tanulmányban három különböző modellben is kimutatták, hogy az Ogg1-et nem kifejező (*Ogg1*<sup>-/-</sup>) egerek ellenállóbbak a gyulladásokkal szemben, mint a vad-típusú egerek (Mabley et al., *FASEB J.* 19: 290–292, 2005). Az *Ogg1*<sup>-/-</sup> egerek szérumában LPS kezelést követően szignifikánsan alacsonyabb volt a kemokinek és a citokinek koncentrációja, valamint hosszabb volt a túlélési idejük, mint a vad-típusú egereknek, annak ellenére, hogy intenzív oxidatív stressz alakult ki a tüdejükben, a szívükben, a veséikben és a májukban. Az *Ogg1*<sup>-/-</sup> egerek szintén védettebbek voltak a streptozotocin indukálta I-es típusú diabétesszel szemben, ugyanis magasabb volt bennük az inzulin szintje, alacsonyabb volt közöttük a cukorbetegség előfordulása, valamint nagyobb volt a  $\beta$ -sejtek száma a kontroll csoporthoz viszonyítva. Mindezek mellett szignifikánsan alacsonyabb volt a hasnyálmirigyükben a MIP-1 $\alpha$ , a TNF- $\alpha$ , és az IL-12 koncentrációja, viszont magasabb volt az IL-10 szintje, mint a vad-típusú társaikéban. A kontakt hiperszenzitivitás modelljében az *Ogg1*<sup>-/-</sup> egerek bőrében kisebb volt a neutrophil sejtek akkumulációja, alacsonyabb volt a kemokinek, valamint a Th1 és Th2 citokinek szintje (Mabley et al., *FASEB J.* 19: 290–292, 2005). Egy másik kísérletben *Helicobacter pylori* fertőzésben vizsgálták az Ogg1 enzim hiányának következményeit. Az *Ogg1*<sup>-/-</sup> egerek gyomrában nem okozott olyan mértékű szöveti léziót a *H. pylori* fertőzés, nem voltak kimutathatóak a fertőzés mutagén hatásai a gyomorfal hámsejtjeiben, és kisebb intenzitásúak voltak a Th1 válaszok az enzimet kifejező egerekhez viszonyítva (Touati et al., *Helicobacter* 11: 494–505, 2006). Li és kollégái (*Free Radic Biol Med* 52: 392–401 2012) a légúti allergiás gyulladás modelljében kimutatták, hogy az *Ogg1*<sup>-/-</sup> egerekben szignifikánsan kisebb volt a gyulladásos sejtek akkumulációja, és alacsonyabb volt a Th1-citokinek (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 és IL-12), a Th2-citokinek (IL-4 és IL-6), valamint az IL-17 szintje a légutakban az allergénnel történő kezelés után, mint a vad-típusú egerekben. Az értekezésemben bemutatott eredményeink alapján, az Ogg1 kifejeződésének lokális gátlása a légúti hámsejtekben szintén alacsonyabb gyulladásos választ eredményezett a parlagfű pollenkivonattal történő kezelést követően, amit a Th2-citokinek mennyisége, az eozinofília mértéke, az epitheloid metaplázia és a fokozott légúti érzékenység meghatározása alapján igazoltunk (Bácsi et al. *DNA Repair* 12: 18-26, 2013). Ugyanakkor, az Ogg-1 kifejeződésének hiánya (*Ogg1*<sup>-/-</sup> egerek) nem befolyásolja az embrionális fejlődést és az állatok élethosszát. Krónikus gyulladásos körülmények között a 8-oxoguanin szint akár 250-szeresére is megemelkedhet az *Ogg1*<sup>-/-</sup> egerekben súlyos következmények nélkül, és a 16 hónapos megfigyelési periódus alatt nem alakultak ki sem tumor-gyanús elváltozások, sem

tumorok az állatokban (Arai et al., *Carcinogenesis* 23: 2005–2010, 2002; Arai et al., *Cancer Res.* 63, 4287-4292, 2003).

Az OGG1 legalább kétféle mechanizmussal járulhat hozzá a gyulladások kialakulásához. 1.) Nagy affinitással köti a DNS-ből kivágott 8-oxoG-t, az aktív centrumától eltérő helyen, és a létrejövő komplex kölcsönhatásba lép a kis GTPázokkal, és elősegíti a megkötött GDP lecserélődését GTP-re. A 8-oxoG-OGG1 komplex hatására létrejövő aktiválódása a kis GTPázoknak szerepet játszhat a légúti gyulladások kialakulásában és a tüdő szöveti átépülésében (Boldogh et al., *J Biol Chem.* 287: 20769-20773, 2012; Hajas et al., *Free Radic Biol Med.* 61: 384-394, 2013; Luo et al., *Free Radic Biol Med.* 73: 430-438, 2014; Ba et al., *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 15: 89-97, 2015). 2.) A promoter szekvenciákban kialakuló 8-oxoguaninhoz kötődő OGG1 olyan szerkezeti változásokat hozhat létre a DNS-ben, ami megkönnyíti az NF- $\kappa$ B DNS-hez való kötődését (Pan et al., *J Biol Chem.* 291: 25553-25566, 2016).

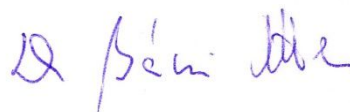
Az oxidatív stressz eredményeként jön létre a 8-oxoguanin a DNS-ben, az OGG1 ismeri fel és vágja ki a módosult bázist, ezért azt várnánk, hogy az oxidatív stressz fokozza az OGG1 aktivitását. Ezzel szemben, az oxidatív stressz gátolja az OGG1 enzim aktivitását (Jaiswal et al., *Cancer Res.* 61: 6388-6393, 2001; Bravard et al., *Mol Cell Biol.* 26: 7430–7436, 2006). Úgy tűnik, hogy a 8-oxoguanin átmeneti felhalmozódása a DNS-ben a sejtek számára kedvező hatással bír, a gyulladást eredményező sejtválaszok pontosabb szabályozását teszi lehetővé. Mindezek fényében az OGG1 kifejeződésének és/vagy enzim aktivitásának gátlása a gyulladások kezelésének új lehetőségét jelentheti.

**8./ Fontos lehet-e, és ha igen, miért, hogy az allergiás egyénekből származó T sejtek autológ, nem aktivált DC hatására több IL-3-at szekretálnak? A hőinaktivált pollennel vajon elképzelhető-e deszenzibilizáló kezelés annak fényében, hogy a velük kezelt DC-k IL10<sup>+</sup> T sejteket aktiválnak?**

**Válasz:** A hivatkozott kísérletben az allergiás egyének T sejtjei mind a háromféle kísérletes beállítás esetén nagyobb mennyiségű IL-3-at termeltek, mint a nem allergiás önkéntesek T sejtjei. A statisztikai elemzés során csak az autológ, nem aktivált DC által indukált IL-3 termelésnél bizonyultak a különbségek statisztikailag szignifikánsnak. Meg kell jegyeznem, hogy csupán 3-3 donorból származó sejtek vizsgálatára volt lehetőségünk.

Az allergiás reakciók kialakulásában számos tényezőt azonosítottak már. Saját eredményeink és korábbi megfigyelések is azt sugallják, hogy az egyik ilyen faktor lehet az atópiás egyének Th1 sejtjeinek csökkent IFN- $\gamma$  termelése (lsd. bővebben az értekezés 104. oldalán). Az atópiás egyének T sejtjeinek fokozott IL-3 termelése, amennyiben a megfigyeléseinket nagyobb populáción végzett vizsgálatok megerősítenék, nem lenne meglepetés, az IL-3 ugyanis számos ponton kapcsolatban állhat az allergiás reakciók kialakulásával. Hematopoetikus növekedési faktorként, az őssejt faktorra (SCF) együtt működve, fokozza a hízósejt prekursorok proliferációját (Akdis et al., *J Allergy Clin Immunol.* 127: 701-721, 2011). Az IL-3 képes aktiválni az érett basophil sejteket, és gátolja azok apoptózist *in vitro* körülmények között (Shen et al., *Int Immunol* 20: 1201-1209, 2008). Az IL-3 hatására a basophilek retinaldehid dehidrogenáz-II enzimet is kifejeznek, ami retinsavat termel. Ez az A-vitamin származék az immunrendszer különböző sejtjeinek a működését is képes szabályozni, például a naív T sejtek Th2 vagy Treg irányú differenciálódását (Spiegl et al., *Blood* 112: 3762-3771, 2008). Az eosinophil sejtek IL-3 hatására HLA-DR-t és CD86 kostimuláló molekulákat fejeznek ki a felszínükön, így képessé válnak naív T sejtek aktiválására (Celestin et al., *J Immunol.* 167: 6097-6104, 2001). Az IL-3 és IL-4 jelenlétében differenciálódó dendritikus sejtek csak kismértékű IL-12 termelésére képesek, ezért elsősorban Th2 immunválaszok indukálására képesek (Ebner et al., *J Immunol.* 168: 6199-6207, 2002). Egy korábbi vizsgálat azt is kimutatta, hogy az IL-3 polimorfizmusa (*Ser27Pro*) kapcsolatban áll az atópia és asthma iránti hajlammal. Ha a Ser aminosav található meg a 27. pozícióban, az fokozott rizikót jelent az allergiás kórképek kialakulására (Park et al., *J Hum Genet.* 49: 517-527, 2004). Mindezek alapján érdemes lenne a vizsgálatokat nagyszámú allergiás és nem allergiás donor T sejtjein is elvégezni.

Eredményeink alapján a hőinaktivált pollen elvileg alkalmas lenne a deszenzibilizáló kezelésre, azonban technikailag a pollen kivonattal végzett kezelés könnyebben kivitelezhető és könnyebben standardizálható.



Dr. Bácsi Attila

egyetemi docens

Debrecen, 2017. június 08.